

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 2 月 20 日 (20.02.2003)

PCT

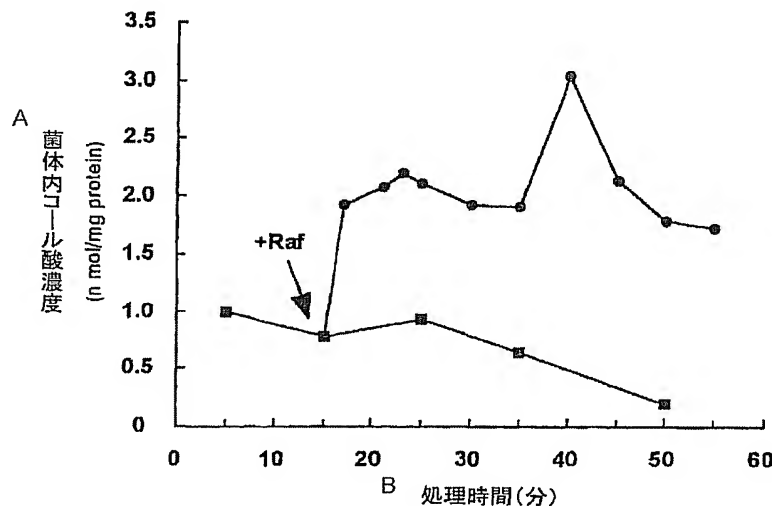
(10) 国際公開番号
WO 03/013559 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 35/74, TECHNOLOGY LICENSING OFFICE CO., LTD.)
31/702, A61P 3/06, 35/00, 43/00 [JP/JP]; 〒060-0808 北海道 札幌市 北区北 7 条西 2 丁目 8 番地 1 Hokkaido (JP). 日本甜菜製糖株式会社 (NIPPON BEET SUGAR MANUFACTURING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒104-0031 東京都 中央区 京橋 2 丁目 3 番地 1 3 号 Tokyo (JP). ホクレン農業協同組合連合会 (HOKUREN FEDERATION OF AGRICULTURAL CO-OPERATIVES) [JP/JP]; 〒060-8651 北海道 札幌市 中央区北 4 条西 1 丁目 3 番地 Hokkaido (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08167
- (22) 国際出願日: 2002 年 8 月 9 日 (09.08.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-244742 2001 年 8 月 10 日 (10.08.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道ティー・エル・オー株式会社 (HOKKAIDO
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横田 篤 (YOKOTA, Atsushi) [JP/JP]; 〒004-0881 北海道 札幌市 清田区平岡公園 6 丁目 7 番 2 号 Hokkaido (JP). 富田 房男 (TOMITA, Fusao) [JP/JP]; 〒063-0824 北海道 札幌市 西区発寒 4 条西 5 丁目 7 ー 8 Hokkaido (JP). 佐山 晃司 (SAYAMA, Kouji) [JP/JP]; 〒080-0836 北海道 帯広市 空港南町 2 9 6 番地 2 7 Hokkaido (JP). 福森

[続葉有]

(54) Title: BILE ACID ABSORBENT/ADSORBENT

(54) 発明の名称: 胆汁酸吸収、吸着剤

A...CHOLIC ACID CONCENTRATION IN CELL
B...TREATMENT TIME (MIN)

(57) Abstract: It is intended to provide bile acid absorbents/adsorbents comprising, as the active ingredients, a lactic acid bacterium, which incorporates bile acid into the cells in the presence of an oligosaccharide but does not release the bile acid from the cells, and the oligosaccharide. Examples of the above-described lactic acid bacterium include *Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius* JCM-1044 strain and *Bifidobacterium breve* JCM-1192 strain. Examples of the oligosaccharide include raffinose, kestose, nystose and trehalose. The bile acid absorbents may be in the form of oral preparations, foods, drinks and so on. These bile acid absorbents/adsorbents are usable as cholesterol-lowering agents and colon cancer inhibitors.

[続葉有]



保則 (HUKUMORI, Yasunori) [JP/JP]; 〒060-0012 北海道 札幌市 中央区北 1 2 条西 1 7 丁目 1-4 クリーンリバー桑園駅前 2 0 6 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 萠 経夫, 外 (HANABUSA, Tsuneo et al.); 〒101-0062 東京都千代田区 神田駿河台 3 丁目 2 番地 新御茶ノ水アーバントリニティ 萠特許事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ,

TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、オリゴ糖の存在下で菌体内に胆汁酸を取り込んで菌体外に胆汁酸を放出しないという性質を有する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とする胆汁酸吸収、吸着剤を提供する。前記乳酸菌としては、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius*) JCM-1044 株、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) JCM-1192 株等がある。また、オリゴ糖としてはラフィノース、kestose、ニストース、トレハロース等があり、胆汁酸吸着剤としては、経口製剤や飲食品等の形態が挙げられる。また、本発明に係る胆汁酸吸収、吸収剤は、コレステロール低減剤、大腸癌発癌抑制剤としても利用できる

明細書

胆汁酸吸収、吸着剤

技術分野

本発明は、胆汁酸吸収、吸着剤に関するものであって、さらに詳細には胆汁酸を吸着および／または吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とする胆汁酸吸収、吸着剤に関するものである。本発明によれば、胆汁酸をビフィズス菌および乳酸菌に吸着させ体外に排泄させることができるので、いわゆる胆汁酸の腸肝循環を一部制御することから、その結果として体内の血清コレステロール濃度を低減させることができ、また大腸内の二次胆汁酸濃度の低下により、大腸癌の発病リスクを低下させることができ、コレステロール低減剤、大腸癌の発癌抑制剤の提供も可能とするものである。

背景技術

人の胆汁酸は、コール酸４０％、ケノデオキシコール酸３０％、デオキシコール酸２０％よりなり、脂肪酸消化吸収に重要な役割をしている。

一方、胆汁酸の効率的利用回路として腸肝循環が行われている。それは使用し終わった胆汁酸を小腸、大腸で再吸収し、再利用する回路である。その再利用率は健常人で９５％以上であり、再利用された胆汁酸に対する小腸各部位における割合は小腸で９０％、大腸で１０％と報告されている（金村稔（１９８２）：日本外科学会誌８３：６７７～６９０）。そして大腸で再吸収しきれなかった胆汁酸に代って必要となった胆汁酸が血液中のコレステロールから肝臓中で生合成される。以上が胆汁酸の腸肝循環の概要である。

従って、胆汁酸の腸肝循環を抑制すれば、例えば腸管からの胆汁酸の再吸収を抑えるべく胆汁酸を何かに吸着させることができれば、排泄される胆汁酸が増え、従って必要となる胆汁酸が血清コレステロールから盛んに合成されるようになり、結果として血清コレステロール濃度が低下する。この考え方で胆汁酸吸着剤なるものが提案され実際にコレスチラミンの名称で医療に使用されている（水島裕、

宮本昭正：今日の治療薬（1995）394）。しかし、この薬剤の実体はイオン交換樹脂であり厳密な処方が必要であり、通常の保健用途には適さない。

本発明は、このような技術の現状に鑑み、胆汁酸を体内から排出、除去することにより、コレステロール濃度が低下し、ヒト血清脂質の代謝が改善され、また大腸内の二次胆汁酸濃度の低下により、大腸癌の発癌リスクが低下する点にも着目し、胆汁酸を低下、除去する技術の重要性を痛感し、胆汁酸を低下、除去する新しいシステムを開発する目的でなされたものである。そのシステムは、有効性はもとより、安全性にも強く配慮した全く新しいタイプの胆汁酸除去システムでなければならない。

発明の開示

本発明者等は、各方面から検討の結果、安全性の面から微生物に着目し、鋭意研究の結果、胆汁酸を取り込みしかもそれを排出しない乳酸菌、胆汁酸を吸収、吸着して放さない乳酸菌が存在すること、しかもこの作用はオリゴ糖の存在下で行われることおよび／またはオリゴ糖の存在下でさらに促進されることを初めて見出し、この有用新知見に基づきさらに研究の結果、ついに本発明の完成に至った。

従って、本発明は第1の観点として、胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする胆汁酸吸収、吸着剤、

第2の観点として、オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする胆汁酸吸収、吸着剤、

第3の観点として、乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第1または第2の観点到記載の胆汁酸吸収、吸着剤、

第4の観点として、オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする、第1ないし第3の観点のうちのいずれか一つに記載の胆汁酸吸収、吸着剤、

第5の観点として、オリゴ糖が、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第1ないし第3の観点のうちのいずれか一つに記載の胆汁酸吸収、吸着剤、

第6の観点として、胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とするコレステロール低減剤、

第7の観点として、オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とするコレステロール低減剤、

第8の観点として、乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第6または第7の観点に記載のコレステロール低減剤、

第9の観点として、オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする、第6ないし第8の観点のうちのいずれか一つに記載のコレステロール低減剤、

第10の観点として、オリゴ糖が、ラフィノース、kestrose、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第6ないし第8の観点のうちのいずれか一つに記載のコレステロール低減剤、

第11の観点として、胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする大腸癌発癌抑制剤、

第12の観点として、オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする大腸癌発癌抑制剤、

第13の観点として、乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第11または第12の観点に記載の大腸癌発癌抑制剤、

第14の観点として、オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする第11ないし第13の観点のうちのいずれか一つに記載の大腸癌発癌抑制剤、そして

第15の観点として、オリゴ糖が、ラフィノース、kestrose、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第11ないし第13の観点のうちのいずれか一つに記載の大腸癌発癌抑制剤に関する。

本発明は、胆汁酸を吸収、吸着する乳酸菌（胆汁酸を吸収および／または吸着する乳酸菌はもとより、その他、胆汁酸を表面に付着する乳酸菌、胆汁酸を菌体内に取り込む乳酸菌等、胆汁酸を保持し得る乳酸菌が全て包含され、しかもさらに胆汁酸を菌体外に排出しない性質が強い乳酸菌が好適であり、これらの乳酸菌

が全て包含される。)を有効成分とする胆汁酸吸収、吸着剤、コレステロール低減剤、並びに大腸癌発癌抑制剤に関し、オリゴ糖を同時および／または別途に使用して体内において乳酸菌とオリゴ糖を共存せしめることにより、乳酸菌の上記作用を生ぜしめおよび／または促進せしめるようにしてなるものである。

図面の簡単な説明

図1は、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius*) JCM-1044株のラフィノース (Raf) の存在下におけるコール酸取り込み活性を示す。

図2は、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) JCM-1192株のラフィノースの存在下におけるコール酸取り込み活性を示す。

図3は、上記JCM-1192株のラフィノースの存在下におけるケノデオキシコール酸の取り込み活性を示す。

図4は、上記JCM-1044株の1-kestose (Kes) の存在下におけるコール酸の取り込み活性を示す。

図5は、上記JCM-1192株の1-kestoseの存在下におけるコール酸の取り込み活性を示す。

図6は、上記JCM-1192株の1-kestoseの存在下におけるケノデオキシコール酸の取り込み活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明では、胆汁酸を吸収、吸着して生体内での胆汁酸量を低減せしめるため上記した性質を有する乳酸菌の一つまたはそれ以上が適宜使用されるが、その好適例の一つとして、オリゴ糖の存在下で菌体内に胆汁酸を取り込んで菌体外に胆汁酸を排出しないという性質を有する乳酸菌が挙げられる。

本発明で利用できる乳酸菌としては、上記した乳酸菌が全て使用可能であって、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属菌やビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属菌等が適宜使用できる。これらの乳酸菌としては、例えば理化学研究所微生物系統保存施設 (JCM) に登録・保存されている菌株を挙げることができる。

理化学研究所微生物系統保存施設（JCM）に登録・保存されている菌株の中で、ラクトバチルス属菌としては、ラクトバチルス・デルブルッキ・サブスピーシーズ・ブルガリクス（*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*）JCM-1002株、ラクトバチルス・アシドフィルス（*Lactobacillus acidophilus*）JCM-1028株、ラクトバチルス・アシドフィルス JCM-1034株、ラクトバチルス・サリバリウス（*Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinus*）JCM-1044株、ラクトバチルス・ヘルベチクス（*Lactobacillus helveticus*）JCM-1062株、ラクトバチルス・ブヒネリ（*Lactobacillus buchneri*）JCM-1115株、ラクトバチルス・マリ（*Lactobacillus mali*）JCM-1116株、ラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）JCM-1149株、ラクトバチルス・サケイ（*Lactobacillus sakei*）JCM-1157株等を使用することができ、またビフィドバクテリウム属菌としては、ビフィドバクテリウム・ブレーベ（*Bifidobacterium breve*）JCM-1192株、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（*Bifidobacterium bifidum*）JCM-1255、ビフィドバクテリウム・インファンティス（*Bifidobacterium infantis*）JCM-1222株等を使用することができる。

なお、これらの乳酸菌はいずれも、JCM菌株カタログに収録されており、自由に分譲、入手することが可能である。

特に好ましい乳酸菌は、上記のJCM-1044株（*Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinus* JCM1044）およびJCM-1192株（*Bifidobacterium breve* JCM1192）であって、これらはそれぞれ2002年8月7日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターへ国際寄託番号FERM BP-8145およびFERM BP-8144の下で寄託されているものである。

これらの乳酸菌は、胆汁酸を吸収、吸着する性質を有するものであるが、この性質はオリゴ糖の存在下で初めて発揮されるかおよび／またはオリゴ糖の存在下でさらに促進される。従って、本発明に係る胆汁酸吸収、吸着剤は、乳酸菌とオリゴ糖を配合した製剤を経口投与する、別々に用意した乳酸菌とオリゴ糖を同時に経口投与する、あるいは生体内、特に腸内にオリゴ糖が存在する場合には乳酸菌のみを経口投与する、あるいは逆にオリゴ糖のみを経口投与する等の投与形態

をとり得るものを全て包含するものであって、経口投与時に常に乳酸菌とオリゴ糖が並存する場合のみに限定されるものではない。なお、以下、本発明を胆汁酸吸収、吸着剤を代表例にとって説明するが、コレステロール低減剤、大腸癌発癌抑制剤の場合も同様である。

本発明に係る胆汁酸吸収、吸着剤を製造するに当っては、製剤化の常法が適宜使用可能であって、有効成分に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤、その他常用される補助剤を加えて、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、ドリンク剤等に製剤化すればよい。なお常法に従い、溶腸剤に製剤化することも可能である。

また、有効成分を飲食品成分と共に、固体状（粉末、顆粒状その他）、ペースト状、液状ないし懸濁状に製剤化してもよいし、発酵乳、チーズ、バター等の乳製品；ドリンクヨーグルトや乳酸菌飲料等の飲料；バターケーキ等の菓子、パン類；その他の飲食品の形態としてもよい。

有効成分としては、乳酸菌およびオリゴ糖を使用するが（両者は常に同時に配合される必要はない）、乳酸菌としては、単離した乳酸菌自体が使用できる他、乳酸菌含有物、同処理物も使用可能であって、これらも本発明における乳酸菌に包含される。

乳酸菌含有物としては、乳酸菌懸濁液、乳酸菌培養物（菌体、培養上清液、培地成分を含む）、乳酸菌培養物から固形分を除去した乳酸菌培養液、乳酸菌飲料、酸乳、ヨーグルト等の乳酸菌発酵した飲食品からなる乳酸菌発酵乳等が挙げられる。

処理物としては、乳酸菌、乳酸菌含有物、発酵乳について、それらの濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物等）、希釈物等が挙げられる。

もう一方の有効成分であるオリゴ糖についても同様であって、精製品、乾燥物等が使用可能である他、発酵法等で製造したオリゴ糖等にあつては、オリゴ糖含有物、同処理物も上記と同様に使用可能である。

オリゴ糖としては、ラフィノース、kestース、ニストース、トレハロース、ラクチュロースの他、各種のオリゴ糖が使用可能であって、市販品も使用可能で

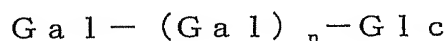
ある。

本発明に使用されるラフィノースとしては、例えば、甜菜根から公知の方法（例えば、特開昭54-49345号公報）で製造されたものや、大豆オリゴ糖（ジャパン・フード・サイエンス、第26巻、第10号、第56～64頁、1987年）として製造され、市販されている粗生成物を直接「ラフィノースを含有するオリゴ糖」として用いることもできる。さらに、大豆ホエーから公知の方法（例えば、特開昭59-179064号公報等）により直接製造したラフィノースであってもよい。

また、本発明に使用されるラクチュロースとしては、公知の方法により乳糖をアルカリ異性化して製造され、シロップ状、粉末状、顆粒状等いずれの剤型のものでも使用できるが、副生成物が少ないことから、例えば、特公昭52-21063号公報に記載の方法により製造したものが望ましい。

また、本発明に使用されるフラクトオリゴ糖としては、1-kestose、ニストース等を例示することができ、ショ糖溶液等から公知の方法（例えば、特開平8-173109号公報、特公昭59-53834号公報等）により、製造することができる。

さらに、ガラクトオリゴ糖としては、次の一般式



[但し、式中、Galはガラクトース残基、Glcはグルコース残基、nは1～4の整数を表す。]で示される化合物を例示することができ、ラクトース溶液から公知の方法（例えば、特公昭58-20266号公報等）により、製造することができる。

市販されているオリゴ糖の例としては、トレハロース（とれはのいのち：㈱エイチプラスビィ・ライフサイエンス社商品名）の他、ラフィノース（日本甜菜製糖社製）、ラクチュロース（森永乳業社製）、ガラクトオリゴ糖（日新製糖社製）、ラクトスクロース（林原商事社製）、フラクトオリゴ糖（明治製菓社製）、イソマルトオリゴ糖（林原商事社製）、キシロオリゴ糖（サントリー社製）等が例示される。

また、オリゴ糖としては、上記した方法で製造したものが使用できる。1-kestose

トース、ニストース、F-ニストースの混合物からなるオリゴ糖についていえば、アスペルギルス・ニガー由来酵素を利用した生産法（特開昭61-268190号公報）、オーレオバシディム・プルランス由来酵素を用いる生産法（特開昭57-166981号公報）が提案されて実施されており、これらの混合物も使用可能である。なお、これらのオリゴ糖の内、特に1-kestoseは、多くの種類の乳酸菌が資化可能（日高秀昌、原哲朗、栄田利章、岡田淳、島田馨、光岡知足：フラクトオリゴ糖の腸内フローラに及ぼす影響、腸内フローラと食物因子（光岡知足編）、第39～66頁、学会出版センター、東京、（1984））なので、例えばスコプラリオプシス・プレビカウリスを用いる1-kestoseの発酵生産（特公平4-41600号公報）またはエウロチウム・リーペンス由来酵素を用いクロマト分離を行い、1-kestoseをリッチにする方法（特開2000-232878号公報）および1-kestose結晶法（特公平6-70075号公報）を組み合わせて生産させる1-kestose結晶を使用すると好適である。また、目的によってはニストース結晶化法（特許第2640577号公報）を用い、ニストース結晶を生産し使用することもできる。

これらの有効成分（乳酸菌、オリゴ糖）は、通常、腸管にまで到達して効果を発揮するが、所望するのであれば、溶腸剤に製剤化して確実性を期してもよいし、腸管内に既に存在している乳酸菌をそのまま利用することも可能である。その場合には、乳酸菌を別途投与することなく、オリゴ糖のみの投与でも充分である。

オリゴ糖としては、難消化性オリゴ糖および易消化性オリゴ糖のいずれもが使用できる。なお、オリゴ糖は腸管にまで達することが必要であるので、易消化性オリゴ糖等の腸管に達し得ないものあるいは腸管にまで達する量が低いものについては、腸溶剤に製剤化する等により対処すればよい。

また、難消化性オリゴ糖、例えばラフィノース、1-kestose、ニストース等は、単糖類や易消化性オリゴ糖とは異なり、通常、分解されることなく腸管にまで達するが、例えばラフィノースの場合、分解されてもビフィズス因子であるメリビオースとなるので、必ずしも不利なものとはならない。このように、オリゴ糖は、所期の効果を発揮するだけでなく、ビフィズス因子や免疫増強因子等としての本来の作用も奏することができ、また、単糖類よりも少ない使用量で済み、

これらの点においても本発明は卓越している。

本発明によれば、このような手段により胆汁酸が血清コレステロールから盛んに合成されるようになり、結果としてコレステロール濃度が低下する。また、一般的に大腸内の胆汁酸の増加は大腸癌の発症に対して促進的に作用する（金澤暁太郎（1984）：日本臨床42：1696～1700）ので、このような方法による胆汁酸吸着作用は大腸癌になるリスクを低減させることもできる。従って本発明は、コレステロール低減剤、大腸癌発癌抑制剤も提供するものである。

次に実施例および製造例を示し、本発明をさらに詳しく説明する。なお、胆汁酸取り込み活性は、以下に示す方法で測定した。

乳酸菌を市販のMR S 培地で一夜培養した。この培地の組成は次の通りであった。

MR S 培地（1 リットル）	
ヘプトン	10 g
肉エキス	10 g
酵母エキス	5 g
リン酸水素 2 カリウム	2 g
クエン酸 2 アンモニウム	2 g
グルコース	20 g
ツイーン 80	1 g
酢酸ナトリウム	5 g
硫酸マグネシウム（7 水和物）	0.58 g
硫酸マンガン（4 水和物）	0.28 g

次に、2代目の培養物を調製し、培養液の濁度（660 nmにおける吸光度）が0.6になった時点で菌体を遠心分離によって回収した。回収した菌体を1 mM硫酸マグネシウムを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で洗浄し、その後、洗浄した菌体を同じ緩衝液中に再懸濁した。この菌体懸濁液を30分間静置することで、菌体の細胞膜を脱エネルギー状態とした。そして、静置した菌体懸濁液を遠心操作して菌体を回収し、さらに1 mM硫酸マグネシウムを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で菌体を洗浄した。その後、洗

浄した菌体を同じ緩衝液中に再懸濁し、菌体懸濁液の滴度が10になるよう調整した。

このようにして調製した菌体懸濁液96 μ lに6 mMコール酸溶液 (14 Cで標識したコール酸 (ケノデオキシコール酸)、16 mCi / mmol) 2 μ lを加えて15分間静置した後、0.33 Mオリゴ糖溶液1 μ lを加えて胆汁酸取り込み活性の測定を開始した。一定時間経過後、100 mM塩酸リチウムを含む100 mMリン酸カリウム緩衝液3 mlを加えて反応を停止し、その後、反応溶液をセルロースアセテート膜 (pore size: 0.45 μ m) で濾過し、膜上に留まった放射エネルギーをシンチレーションカウンタで測定した。また、対照として、オリゴ糖を加えないのものについても同様に放射エネルギーを測定した。

実施例 1

ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* ssp. *Salicinius*) JCM-1044株について、胆汁酸取り込み活性を測定した。その結果を図1に示す。なお図中において、オリゴ糖使用区 (試験区) は黒丸、非使用区 (対照区) は黒四角で示す (以下、同じ)。

ラフィノースは反応開始後15分の時点で添加した。ラフィノースを加えない菌体懸濁液では、菌体内に胆汁酸が取り込まれず菌体内のコール酸濃度は変化しなかった。一方、ラフィノースを加えた菌体懸濁液では、速やかに菌体内にコール酸が取り込まれ、菌体内のコール酸濃度は菌体外の約8倍に上昇した。

菌体懸濁液に添加したラフィノースがほぼ消費されたと考えられる時点 (反応時間40分の時点) 以降は、コール酸の受動的な排出が発生し、その結果、菌体内のコール酸濃度は徐々に低下した。

実施例 2

ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) JCM-1192株について、胆汁酸取り込み活性を測定した。その結果を図2に示す。

ラフィノースは反応開始後15分の時点で添加した。実施例1と同様、ラフィノースを加えない菌体懸濁液では、菌体内に胆汁酸が取り込まれず菌体内のコール酸濃度は変化しなかった。

ル酸濃度は変化しなかった。一方、ラフィノースを加えた菌体懸濁液では、速やかに菌体内にコール酸が取り込まれ、菌体内のコール酸濃度は菌体外の約 30 倍に上昇した。

菌体懸濁液に添加したラフィノースがほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間 60 分の時点）以降は、コール酸の受動的な排出が発生し、その結果、菌体内のコール酸濃度は徐々に低下した。

実施例 3

ビフィドバクテリウム・ブレーベ JCM-1192 株について、ケノデオキシコール酸の取り込み活性を測定した。その結果を図 3 に示す。

ラフィノースは反応開始後 15 分の時点で添加した。ラフィノースを加えない細胞懸濁液では、菌体内にケノデオキシコール酸が取り込まれず菌体内のケノデオキシコール酸濃度は変化しなかった。一方、ラフィノースを加えた細胞懸濁液では、速やかに菌体内にケノデオキシコール酸が取り込まれ、菌体内ケノデオキシコール酸濃度は菌体外の約 6 倍に上昇した。

細胞懸濁液に添加したラフィノースがほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間 30 分の時点）以降は、ケノデオキシコール酸の受動的な排出が発生し、その結果、菌体内のケノデオキシコール酸濃度は徐々に低下した。

製造例 1

ケストース結晶の製造法

（1）エウロチウム・リーペンス由来酵素の生産

炭素源としてショ糖 30%、窒素源として酵母エキス 1.5% を含み、燐酸カリウム、硫酸マグネシウム各 0.2% よりなる溶液を pH 6 とした培養液 200 L をジャーファーメンターに調製し、滅菌後あらかじめ同一組成で 48 時間振とう培養したエウロチウム・リーペンスを接種し 30℃ で 48 時間、1/2 VVM で通気培養を行い、菌体を濾過分離し湿菌体 6 kg を得た。この物を粗酵素として次の反応を行った。

（2）酵素反応

反応溶液としてショ糖濃度を70% (W/V) とした1 m³を調製しpH6とした後、反応温度55℃とし、それに上記湿菌体5 kgを投入し16時間攪拌しながら反応させた。その結果反応液の糖組成は全糖質当たり、1-kestose 30%、nystose 9%、glucose 20%、fructose 2%、ショ糖33%の糖組成物ができた。以上反応を5サイクル実施し、下記クロマト分離により1-kestoseを分離精製した。

(3) クロマト分離

上記糖組成物から1-kestoseを主体とするオリゴ糖区分と主にショ糖とglucoseよりなるその他の区分に分けるクロマト分離を1 m³容量の擬似移動床式クロマト分離装置（分離剤としては、陽イオン交換樹脂UBK530（三菱化学社製）を使用した。）を用いて行った。分離条件は運転負荷が0.05 v/v·h、使用水量を5.33 (D/F) とした。得られたオリゴ糖区分の糖組成は1-kestose 72%、nystose 19%、ショ糖2%であり、1-kestoseの回収率は94%であった。

次に、このオリゴ糖区分を65% (W/W) まで濃縮したものを原液として同一のクロマト分離装置の分離条件を変更し1-kestose区分と主にnystoseからなるnystose区分に分ける分離を行った。分離条件は運転負荷が0.04 v/v·h、使用水量を5.0 (D/F) とした。得られたkestose区分の糖組成は1-kestose 89%、nystose 3%、ショ糖3%であり、1-kestoseの回収率は63%であった。以上の結果、処理液として900 L (70% (W/V) とした) を得た。これを結晶母液として下記結晶化を行いさらに純度を上げた。

(4) 結晶化工程

500 L結晶缶を用い、上記kestose区分の一部をこれに投入し、89% (W/W) まで濃縮した時点であらかじめ調整した種結晶を投入し、85℃で3時間の煎糖を行った。その後、80から65℃の温度コントロールを行う助晶を17時間行った後、遠心分離器で結晶を回収し、乾燥冷却した。得られた結晶製品の重量は453 kgで母液中のkestoseに対する回収率は50%で、純度は98%であった。

実施例 4

ラクトバチルス・サリバリウス JCM-1044 株について、胆汁酸取り込み活性を測定した。その結果を図 4 に示す。なお、1-kestose としては製造例 1 にて製造した結晶製品を使用した。

1-kestose は反応開始後 15 分の時点で添加した。1-kestose を加えない細胞懸濁液では菌体内にコール酸は取り込まれず、1-kestose を加えた細胞懸濁液では速やかに菌体内にコール酸が取り込まれ、菌体内のコール酸濃度は菌体外の約 1.3 倍に上昇した。菌体懸濁液に添加した 1-kestose がほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間 40 分の時点）以降はコール酸の受動的な排出が発生する傾向が現れた。

実施例 5

ビフィドバクテリウム・ブレーベ JCM-1192 株についてコール酸の取り込み活性を測定した。その結果を図 5 に示す。1-kestose は反応開始後 15 分の時点で添加した 1-kestose を加えない細胞懸濁液では菌体内にコール酸は取り込まれず、1-kestose を加えた細胞懸濁液では速やかに菌体内にコール酸が取り込まれ、菌体内コール酸濃度は菌体外の約 2.4 倍に上昇した。菌体懸濁液に添加した 1-kestose がほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間 80 分の時点）以降はコール酸の受動的な排出が発生した。また、ビフィドバクテリウム・インファンティス JCM-1222 株についても、ニストースを添加した細胞懸濁液での菌体内へのコール酸の取り込みが確認された。

実施例 6

ビフィドバクテリウム・ブレーベ JCM-1192 株についてケノデオキシコール酸の取り込み活性を測定した。その結果を図 6 に示す。

1-kestose は反応開始後 15 分の時点で添加した。1-kestose を加えない細胞懸濁液では菌体内にケノデオキシコール酸は取り込まれず、1-kestose を加えた細胞懸濁液では速やかに菌体内にケノデオキシコール酸が取り込ま

れ、菌体内ケノデオキシコール酸濃度は菌体外の最大約15倍に上昇した。細胞懸濁液に添加した1-kestoseがほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間30分の時点）以降はケノデオキシコール酸の受動的排出が発生し、その結果菌体内のケノデオキシコール酸濃度は徐々に低下したが、約2倍で平衡した。

実施例7

ケストース錠剤の製造法

1-kestose 50%、デキストリン30%、植物油脂20%の混合比にして打錠機により一粒150mgの錠剤を作成した。錠剤強度は4.2kgであった。

実施例8

ビフィドバクテリウム・ブレーベJCM-1192株と上記オリゴ糖の配合錠剤の製造

ビフィドバクテリウム・ブレーベJCM-1192株をMRS培地に接種し、37℃で24時間静置培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収した。5%ショ糖、5%可溶性澱粉、5%グルタミン酸ナトリウム、および1%硫酸マグネシウム7水和物を含む分散媒中に上記菌体を混合し、混合液のpHを7.0にした後、混合物を凍結乾燥した。

このように調製した乾燥菌体粉末2mgに1-kestoseまたはニストースを100mg、デキストリン60mg、ポリビニルピロリドンK25を18mg、ステアリン酸マグネシウム0.8mgを加えて均一に混合し、打錠機で圧縮成形しオリゴ糖とビフィズス菌を含む一錠200mgの2種類の錠剤を製造した。

産業上の利用可能性

本発明の方法によると、オリゴ糖の存在下でビフィズス菌、乳酸菌の菌体内に胆汁酸を取り込ませることができ再び排出されないことを見出し、オリゴ糖を胆汁酸取り込み誘因物質として使用できるので、これらの糖質を上記ビフィズス菌、乳酸菌と共にあるいは腸内にいる常在菌の増加を期待して上記糖質単独で使用し、血清コレステロール濃度を低下させたり、大腸癌の発癌リスクを低減させること

ができる。とりわけ、発癌抑制は少量の有効成分でも効果が奏されるので、医薬品のほか、発癌予防や手術後における再発防止等の目的で、飲食品の形態で投与することもできる。

請 求 の 範 囲

1. 胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする胆汁酸吸収、吸着剤。
2. オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする胆汁酸吸収、吸着剤。
3. 乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項1または2に記載の胆汁酸吸収、吸着剤。
4. オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする、請求項1ないし3のうちのいずれか一項に記載の胆汁酸吸収、吸着剤。
5. オリゴ糖が、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項1ないし3のうちのいずれか一項に記載の胆汁酸吸収、吸着剤。
6. 胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とするコレステロール低減剤。
7. オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とするコレステロール低減剤。
8. 乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項6または7に記載のコレステロール低減剤。
9. オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする、請求項6ないし8のうちのいずれか一項に記載のコレステロール低減剤。
10. オリゴ糖が、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項6ないし8のうちのいずれか一項に記載のコレステロール低減剤。
11. 胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする大腸癌発癌抑制剤。
12. オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を

有効成分とすることを特徴とする大腸癌発癌抑制剤。

13. 乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項11または12に記載の大腸癌発癌抑制剤。

14. オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする請求項11ないし13のうちのいずれか一項に記載の大腸癌発癌抑制剤。

15. オリゴ糖が、ラフィノース、kestose、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項11ないし13のうちのいずれか一項に記載の大腸癌発癌抑制剤。

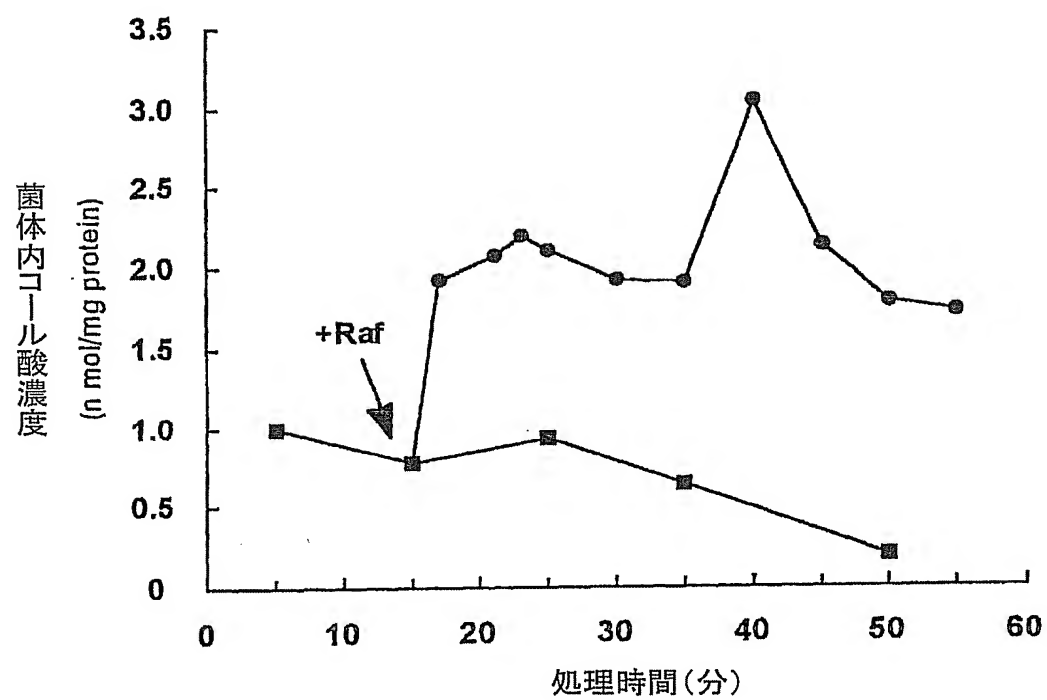


図 1

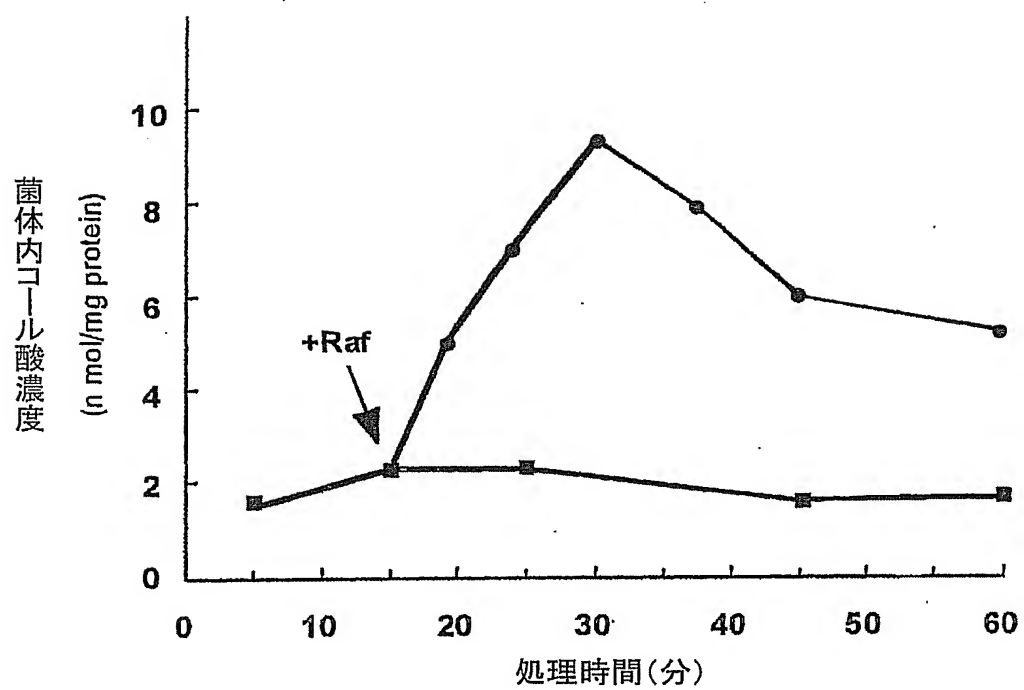


図 2

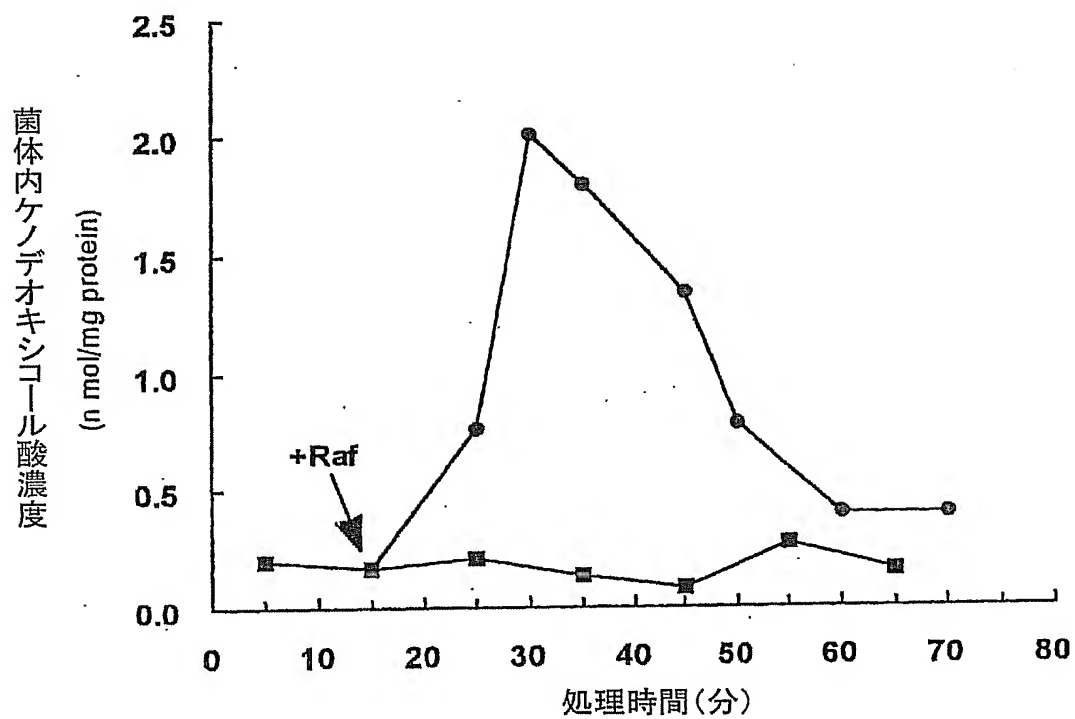


図 3

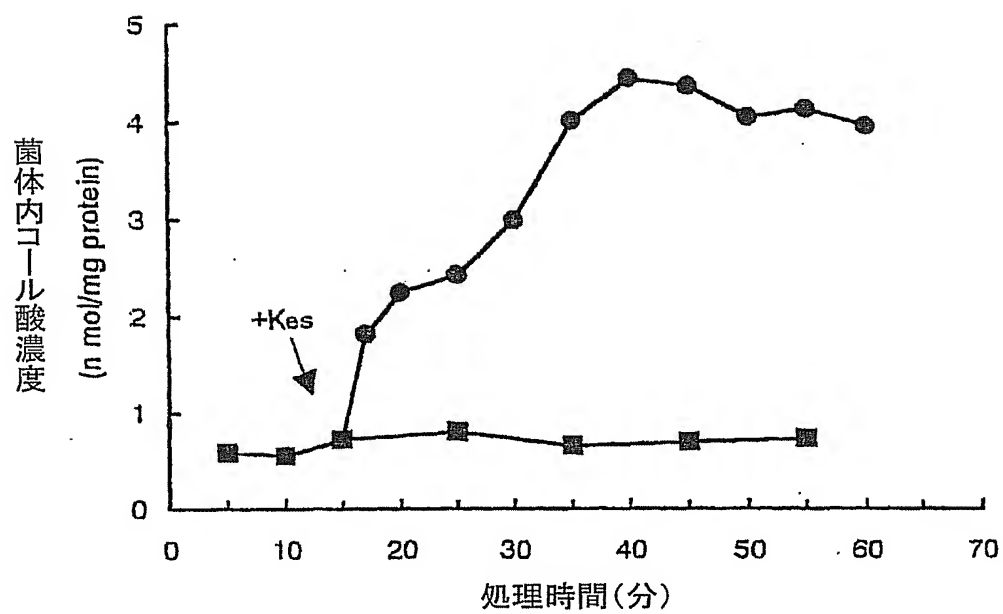


図 4

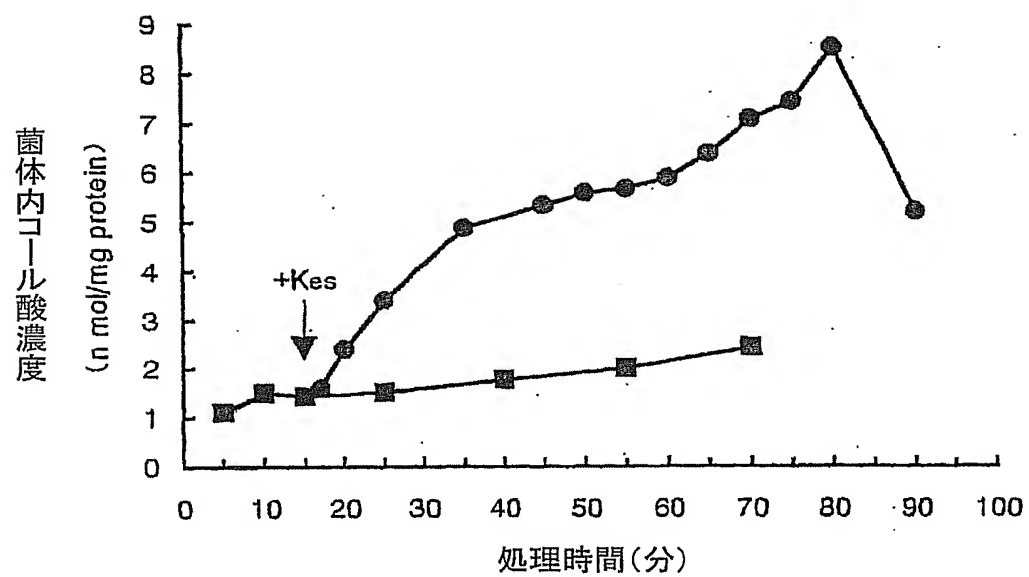


図 5

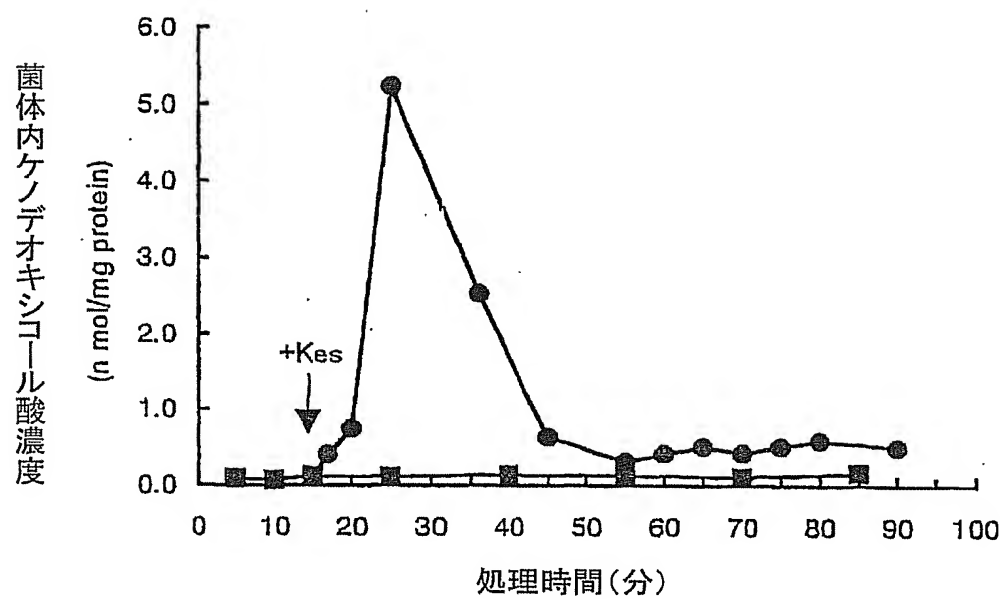


図 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/74, 31/702, A61P3/06, 35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/74, 31/702, A61P3/06, 35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-97870 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 10 April, 2001 (10.04.01), Abstract; Claims; Par. Nos. [0009], [0030] & Chem.abstr., 2001, Vol.134 (Columbus, OH, USA), the abstract No.271276	1-15
A	Atsushi YOKOTA et al., "Chonai Sakkin no Shinkino: Lactobacillus-Zoku Nyusankin ni yoru Tanjusan Yuso to Probiotics Mechanism", The Society for Bioscience and Bioengineering Shi, 2001 June, Vol.79, No.6, pages 176 to 177 & Chem.abstr., 2001, Vol.135 (Columbus, OH, USA), the abstract No.329461	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 November, 2002 (08.11.02)Date of mailing of the international search report
19 November, 2002 (19.11.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08167

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-239476 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 07 September, 1999 (07.09.99), & JP 3158090 B & Chem.abstr., 1999, Vol.131 (Columbus, OH, USA), the abstract No.182260	1-15
A	Atsushi YOKOTA et al., "Nyusankin no Tanjusan Taisei to sono Mechanism", Journal of Japan Society for Lactic Acid Bacteria, 1998, Vol.9, No.1, page 17	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61K35/74,31/702,A61P3/06,35/00,43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61K35/74,31/702,A61P3/06,35/00,43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-97870 A(雪印乳業株式会社)2001.04.10 【要約】、【特許請求の範囲】、【0009】、【0030】 & Chem. abstr., 2001, Vol.134(Columbus, OH, USA), the abstract No.271276	1-15
A	横田 篤 等、腸内細菌の新機能: <i>Lactobacillus</i> 属乳酸菌による 胆汁酸輸送とプロバイオティックスメカニズム、生物工学会誌、2001 年6月、第79巻、第6号、第176-177ページ & Chem. abstr., 2001, Vol.135(Columbus, OH, USA), the abstract No.329461	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.11.02

国際調査報告の発送日

08.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

清原 下 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 11-239476 A(雪印乳業株式会社)1999.09.07 & JP 3158090 B & Chem. abstr., 1999, Vol.131(Columbus, OH, USA), the abstract No.182260	1-15
A	横田 篤 等、乳酸菌の胆汁酸耐性とそのメカニズム、日本乳酸菌 学会誌、1998年、第9巻、第1号、第17ページ	1-15